

有糸分裂期の機能性ヌクレオポリン：大腸がんの病態解明と治療への応用

著者	橋爪 智恵子, 源 俊成, Wong Richard W.
著者別表示	Hashizume Chieko, Minamoto Toshinari, Wong Richard W.
雑誌名	Journal of Japanese Biochemical Society
巻	88
号	6
ページ	748-751
発行年	2016
URL	http://doi.org/10.24517/00050485

doi: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880748



【投稿：2016 年 5 月 27 日受付】

【再投稿：2016 年 6 月 14 日受付】

生化学

有糸分裂期の機能性ヌクレオポリン：大腸がんの病態解明と治療への応用

橋爪 智恵子¹, 源 利成², Richard W. Wong³

¹金沢医科大学医学部血液免疫内科学（〒920-0293 石川県河北郡内灘町大学 1-1）

²金沢大学がん進展制御研究所腫瘍制御研究分野（〒920-0934 金沢市宝町 13-1）

³金沢大学新学術創成研究機構セルバイオノミクスユニット(〒920-1192 金沢市角間町)

Mitotic nucleoporin orchestrates colorectal carcinogenesis

Chieko Hashizume¹, Toshinari Minamoto², Richard W. Wong³

(¹ Division of Hematology/Immunology, Department of Medicine, Kanazawa Medical University, 1-1 Daigaku, Uchinada, Ishikawa 920-0293, Japan; ² Divisions of Translational and Clinical Oncology and Surgical Oncology, Cancer Research Institute and Cancer Center, Kanazawa University and Hospital, 13-1 Takara-machi, Kanazawa, 920-0934, Japan, ³ Cell-bionomics Research Unit, Innovative Integrated Bio-Research Core, Institute for Frontier Science Initiative; Bio-AFM Frontier Research Center & Lab of Molecular Cellular Biology, School of Natural System; Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192, Japan)

ダイジェスト（120 字以内、目次のタイトル下に入ります）：

ヌクレオポリン Nup358/RanBP2 は有糸分裂期で染色体分離を制御する。本稿では、Nup358/RanBP2 発現亢進と大腸がんの有糸分裂期での細胞死回避機構の関係、さらにはこの機構を標的とした大腸がん治療の応用について紹介する。

図版（冊子体の場合）： モノクロ印刷希望 カラー印刷希望 【どちらかお選びください】

（電子版は無料でカラー掲載いたします。冊子体は原則モノクロ印刷となり、カラー印刷ご希望の場合は規定により実費をご負担いただきます。あらかじめご了承ください）

1. はじめに

真核細胞の核膜孔を形成する核膜孔複合体（nuclear pore complex：NPC）は核膜を貫通する巨大なタンパク質チャネルである。ヒトの NPC は 110 MDa という大きな構造体であり、30 種類以上のヌクレオポリンと呼ばれるタンパク質から構成されている。NPC は細胞分裂の間期（G1-S-G2 期）では、核－細胞質間分子輸送を制御している^{1,2)}（図 1A）。一方、NPC は有糸分裂期（M 期）の核膜崩壊の際に、いくつかのサブ複合体に乖離することが知られているが、その役割は長い間不明であった。しかし近年、それらサブ複合体中のヌクレオポリンが M 期の染色体分離に関与することが次々と明らかにされてきた³⁾。

これまでに著者らは、ヌクレオポリンの一つである Nup358/Ran binding protein 2 (RanBP2) が M 期において紡錘体のキネトコア領域に局在し染色体分離を制御すること、培養細胞の Nup358/RanBP2 をノックダウンすると M 期での細胞死が増加することを見いだしている⁴⁾。我々が報告したこの知見を受けて Vecchione らのグループが、Nup358/RanBP2 をノックダウンすると特定の遺伝子型を示す大腸がん細胞特異的に M 期での細胞死が増加する、即ちこの種の大腸がん細胞の生存には Nup358/RanBP2 が必須であるという興味深い研究を最近の *Cell* 誌に報告した⁵⁾。

本稿ではまず、ヌクレオポリン Nup358/RanBP2 の細胞分裂 M 期での役割を解説する。ついで、上述した Nup358/RanBP2 と大腸がんに関する Vecchione らの研究⁵⁾を紹介する。そして、M 期に紡錘体形成を阻害することで細胞死作用を持つ微小管重合阻害剤に対する大腸がん細胞の感受性と Nup358/RanBP2 発現との関係、および大腸がん治療の臨床試験への応用について概説する。

2. ヌクレオポリン Nup358/RanBP2 の細胞分裂 M 期における役割

NPC を構成するヌクレオポリンの多くは、それぞれの分子量によって“NupX”（X は分子量 kDa）と呼ばれている。NPC 内での局在をもとに、ヌクレオポリンは六つの構成要素

(pore membrane proteins (POMs)、Y 型コア、アダプター、チャネル、核バスケット) に分類され、これらは生化学的に安定な複合体を形成している (図 1 A)。また、これらの構成要素の分類とは関係なく、多くのヌクレオポリンに存在するフェニルアラニン-グリシン(FG)リピート配列は NPC の中央に配置されて疎水性バリアを形成し、物質輸送を制御する。近年、NPC の機能として、従来の細胞分裂間期での分子輸送制御^{1, 2)}に加え、M 期での役割が注目されている。M 期初期の核膜崩壊とともに複数のヌクレオポリン複合体が乖離し、そのいくつかのヌクレオポリンがキネトコア、紡錘体、中心体に局在を変える¹⁾ (図 1A、詳しくは著者らの総説⁶⁾を参照されたい)。このような過程でヌクレオポリンは有糸分裂過程に形成される微細構造体 (キネトコア、紡錘体、中心体等) の集合、機能的構造形成と分離を制御し、正確な染色体分離に必要である。したがって、ヌクレオポリンはゲノムを保全するために必須の分子である。

Nup358/RanBP2 は NPC の細胞質線維構造を構成し、細胞質リングに結合している (図 1A)。ヒトでは 3,224 アミノ酸残基からなる 358 kDa の大きなタンパク質であり、特徴的な N 末端ロイシンリッチドメイン、四つの Ran 結合ドメイン、八つのタンデム Zinc フィンガー、small ubiquitin-like modifier (SUMO) E3 リガーゼドメイン、FG リピート、C 末端 cyclophilin ホモロジドメインを持つ (図 1B)。Nup358/RanBP2 には karyopherin/importin と呼ばれる核移行受容体と Ran guanosine triphosphate hydrolase (GTPase) が結合し、核-細胞質間輸送を制御するが、それ以外にもさまざまなドメイン構造を介して多様な機能を持つ。M 期には、Nup358/RanBP2 は Ran GTPase activating protein 1 (RanGAP1) とともにキネトコアや紡錘体に局在する^{4, 7, 8)}。著者らは、細胞内の Nup358/RanBP2 を欠失させると G2/M 期停止と染色体分離の不全が起こり、M 期の崩壊 (mitotic catastrophe) と細胞死・アポトーシスを引き起こすことを明らかにした⁴⁾。これは即ち、Nup358/RanBP2 が M 期において正確な染色体分離に機能することを示し、一方で Nup358/RanBP2 が M 期で本来の役割を果たせない場合、細胞の形質転換やがん化を来すことを示唆している。

3. Nup358/RanBP2 と BRAF 様大腸がん細胞の関係

ヌクレオポリンと疾患との関連では興味深いことに、Nup358/RanBP2 はがんに対して相反する作用が報告されてきた。一方では、Nup358/RanBP2 ノックアウトマウスは発がんしやすいことから、Nup358/RanBP2 は染色体分離異常を防ぐことでがん抑制因子として機能していると考えられている⁹⁾。他方では、Nup358/RanBP2 は染色体転座により血液系腫瘍を形成することから、潜在的にがん化を引き起こす役割を持つとも考えられている¹⁰⁾。最近報告された Vecchione らの研究結果は、Nup358/RanBP2 の発現亢進を特徴とする大腸がん細胞は M 期崩壊による細胞死から回避される⁵⁾ というもので、Nup358/RanBP2 のがん促進作用を示唆している。

本邦において、大腸がんは女性のがん死の 1 位、男性では 3 位に相当する死亡数の多いがん種である。大腸がんは、遺伝性がんとして家族性大腸腺腫症や遺伝性非ポリポーシス大腸がん (Lynch 症候群) がよく知られているが、大多数を占める孤発がんの発生は喫煙、食生活の欧米化、運動不足などの生活習慣に起因すると考えられている。大腸がんの発がん過程は多段階的であり、正常上皮細胞が腺腫になり、時間を経て腺がんに進展して大腸組織に浸潤し、リンパ流や血流を介してリンパ節や他の組織、臓器に転移していくことが知られている^{11,12)}。そして、この発がん過程においてさまざまな遺伝子変異が蓄積していくことが示されている。大腸がんのおよそ 40% は *K-ras* 変異により、また約 10% は *B-raf* 遺伝子コドン 600 (V600E) 変異によりがん化シグナルを活性化し、これらの変異は相互排他的に生じている¹¹⁾。一方、*K-ras* 変異の有無にかかわらず、*B-raf* 野生型大腸がんの一部は *B-raf* 変異型と同様の遺伝子発現特性を呈する。そして、両者を合わせた “BRAF 様 (BRAF-like)” 大腸がんは全体のおよそ 20% に相当し、悪性度が高く予後が悪いとされている¹²⁾。

Vecchione らはこの BRAF 様大腸がんに注目し、*B-raf* (V600E) 変異腫瘍の治療に有用な

標的遺伝子を明らかにするため、short hairpin (sh) RNA ライブラリーを用いた loss-of-function アプローチによって、BRAF 様大腸がん細胞の生存に必須となる遺伝子を探索した。BRAF 様大腸がん細胞で選択的に高発現であった 363 遺伝子に対して 1,586 種類の shRNA ウイルスベクターを準備し、B-raf (V600E) 変異大腸がん細胞株と B-raf 野生型大腸がん細胞株に導入して、腫瘍細胞生存に対する効果を比較した。その結果、Nup358/RanBP2 遺伝子に特異的な shRNA ベクターを導入された BRAF 様大腸がん細胞は致死的であった (図 2)。これまでの報告^{4,7,8)} と一致して、彼らは Nup358/RanBP2 ノックダウンがキネトコア構造、M 期進行と染色体分離の異常を引き起こすことを見いだした。また、Nup358/RanBP2 ノックダウンは、BRAF 様大腸がん細胞に M 期での細胞死を誘導する M 期延長や M 期での細胞周期停止を引き起こすことを見いだした。これらの知見は、これまでに著者らが子宮頸がん HeLa 細胞で示した結果と合致する⁴⁾。Vecchione らはまた、BRAF 様大腸がん細胞はもともとキネトコアでの微小管伸長が不全であり、Nup358/RanBP2 ノックダウンによってさらにこの不全を助長して M 期の細胞死を誘導することを見いだした。これらの結果から、BRAF 様大腸がん細胞は Nup358/RanBP2 の高発現により、M 期におけるキネトコアからの微小管伸長の不全を防いでいると考えられる。

4. BRAF 様大腸がん細胞に対する微小管重合阻害剤ビノレルビンの効果

BRAF 様大腸がん細胞における M 期での微小管形成の選択的不全は、このような腫瘍が微小管重合阻害剤に潜在的に高感受性であることを示唆している。そこで Vecchione らは、がんの薬剤感受性ゲノミクスプロジェクトのデータベースを調べたところ、彼らの仮説と一致して BRAF 様大腸がん細胞は非 BRAF 様腫瘍細胞よりも M 期特異的に作用する抗がん剤に高感受性であることがわかった¹³⁾。つぎに彼らはこの仮説を独自に検証するために、微小管重合阻害剤のなかでもビンカアルカロイド化合物のビノレルビンとビンブラスチンを、またタキサン類のパクリタキセルとドセタキセルの腫瘍細胞に対する生存阻害効果を

測定した。その結果、これらの薬剤のうちビノレルビンのみが非 BRAF 様に比べて BRAF 様大腸がん細胞に対して有意に高い生存阻害効果を示し、その IC₅₀ (50%阻害濃度) は両細胞間で 30 倍以上の差があることがわかった。なお、ビノレルビンはこれまで乳がんおよび非小細胞肺癌の治療に用いられてきた抗がん剤である。

つぎに Vecchione らはビノレルビンの生体内での効果を試すため、ヒト大腸がん細胞の異種移植モデルマウスを用いて解析した。その結果、BRAF 様大腸がん細胞の移植腫瘍に対して選択的にビノレルビンが抗腫瘍効果を示すことがわかった。さらに、大腸がんの遠隔転移は肝臓に多い¹¹⁾ ことに着目し、大腸がんの肝転移腫瘍に対するビノレルビンの効果を試すため、ヒト大腸がん細胞をマウス肝に移植し、生体内顕微鏡を用いてビノレルビンによる治療経過を観察した。その結果、BRAF 様大腸がん細胞では染色体分離不全と、染色体が断片化されたアポトーシス細胞が多数観察された。この結果は、肝転移した BRAF 様大腸がんはビノレルビンに感受性であることを示唆している。

Vecchione らは上記の実験的効果をもとに、実際の臨床検体を用いて BRAF 様大腸がんに対する微小管重合阻害剤の有効性を確かめるため、これまでの臨床試験でビンブラスチンとカルシウムチャンネルブロッカーのベプリジルを併用処方された大腸がん患者 15 名のうち¹⁴⁾、20 年間再発していない 1 名の患者の切除腫瘍について遺伝子解析を行った。その結果、この症例の大腸がんは K-ras 遺伝子変異と BRAF 様遺伝子発現パターンが見いだされたことから、微小管重合阻害剤のような微小管ダイナミクスを標的とする抗がん剤は BRAF 様腫瘍に特異的な治療薬になりうることを示唆された。

5. おわりに

Vecchione らによる今回の研究は、大腸がんのなかでも悪性度の高い BRAF 様大腸がんが有糸分裂 M 期での細胞死を回避するために Nup358/RanBP2 を高発現させていることを発見した。そして、微小管重合阻害剤のビノレルビンが、このヌクレオポリンによる M 期での

染色体分離不全を回避するメカニズムを標的として腫瘍細胞死を誘導することを明らかにした。とくに、**BRAF** 様と非 **BRAF** 様大腸がんという遺伝子変異や発現様式が異なる大腸がん細胞に対する微小管重合阻害剤の効果を比較し、ビノレルビンが **BRAF** 様大腸がんを選択的な治療効果を示したことは注目に値する。この非臨床研究の結果は、すでに各国で抗がん剤として認可されているが、大腸がん治療薬として承認されていないビノレルビンなどの有糸分裂 **M** 期に作用する微小管重合阻害剤が、**BRAF** 様大腸がんのような特定の遺伝子変異・発現パターンを示す大腸がん患者に対して特異的に効果がある可能性を示したことに大きな価値がある。

今後も、有糸分裂に特異的に作用するヌクレオポリンの機能および、それらがさまざまな病態進行にいかに関与するのかが明らかにされていくことで、NPC が関与する疾患の生物学的病態と治療標的が明らかにされていくと期待される。

- 1) Wong, R.W. (2015) *Chem. Biol.*, 22, 1285-1287.
- 2) 小迫英尊 (2015) 生化学, 87, 49-55.
- 3) Nakano, H., Wang, W., Hashizume, C., Funasaka, T., Sato, H., & Wong, R. W. (2011) *Cell Cycle*, 10, 425-433.
- 4) Hashizume, C., Kobayashi, A., & Wong, R. W. (2013) *Cell Death Dis.*, 4, e854.
- 5) Vecchione, L., Gambino, V., Raaijmakers, J., Schlicker, A., Fumagalli, A., Russo, M., Villanueva, A., Beerling, E., Bartolini, A., Mollevi, D. G., et al. (2016) *Cell*, 165, 317-330.
- 6) 橋爪智恵子, Wong, R. (2011) 生化学, 83, 957-965.
- 7) Joseph, J., Liu, S. T., Jablonski, S. A., Yen, T. J., & Dasso, M. (2004) *Curr. Biol.*, 14, 611-617.
- 8) Salina, D., Enarson, P., Rattner, J. B., & Burke, B. (2003) *J. Cell Biol.*, 162, 991-1001.
- 9) Dawlaty, M. M., Malureanu, L., Jeganathan, K. B., Kao, E., Sustmann, C., Tahk, S., Shuai, K., Grosschedl, R., & van Deursen, J. M. (2008) *Cell*, 133, 103-115.
- 10) Nofrini, V., Di Giacomo, D., & Mecucci, C. (2016) *Eur. J. Hum. Genet.*, <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2016.25>.
- 11) Carethers, J. M. & Jung, B. H. (2015) *Gastroenterology*, 149, 1177-1190.e3.
- 12) Popovici, V., Budinska, E., Tejpar, S., Weinrich, S., Estrella, H., Hodgson, G., Van Cutsem, E., Xie, T., Bosman, F. T., Roth, A. D., & Delorenzi, M. (2012) *J. Clin. Oncol.*, 30, 1288-1295.
- 13) Garnett, M. J., Edelman, E. J., Heidorn, S. J., Greenman, C.D., Dastur, A., Lau, K. W., Greninger,

P., Thompson, I. R., Luo, X., Soares, J., et al. (2012) *Nature*, 483, 570-575.

14) Linn, S. C., Giaccone, G., & Pinedo, H. M. (1994) *Lancet*, 343, 1648-1649.

図1 スクレオポリン Nup358/RanBP2 の役割と構造

(A) 細胞分裂間期における核膜孔複合体 (NPC) の構造 (左)。約 30 種のスクレオポリンは六つの構成要素 (pore membrane proteins (POMs)、Y 型コア、アダプター、チャネル、核バスケット) に分類される。NPC の中央に位置するスクレオポリンのフェニルアラニン-グリシン (FG) リピート配列は、疎水性バリアを形成することで物質輸送を制御する。Nup358/RanBP2 (赤) は、間期では NPC の細胞質線維構造を形作り、細胞質-核間の物質輸送を制御する (左) 一方、M 期では紡錘体-キネトコア領域に局在し、染色体分離に寄与する (右)。(B) Nup358/RanBP2 のドメイン構造。N 末端からロイシンリッチドメイン (LRD)、四つの Ran 結合ドメイン、八つのタンデム Zinc フィンガー (Zinc)、SUMO E3 リガーゼドメイン (E3)、FG リピート、C 末端 cyclophilin ホモロジードメイン (CY) を持つ。

図2 BRAF 様大腸がん細胞に対する Nup358/RanBP2 ノックダウンおよびビノレルビン処理の効果

BRAF 様大腸がん細胞に Nup358/RanBP2 ノックダウン、またはビノレルビン処理すると、非 BRAF 様大腸がん細胞と比較して染色体分離不全が増加し、その結果細胞死が有意に増加する。

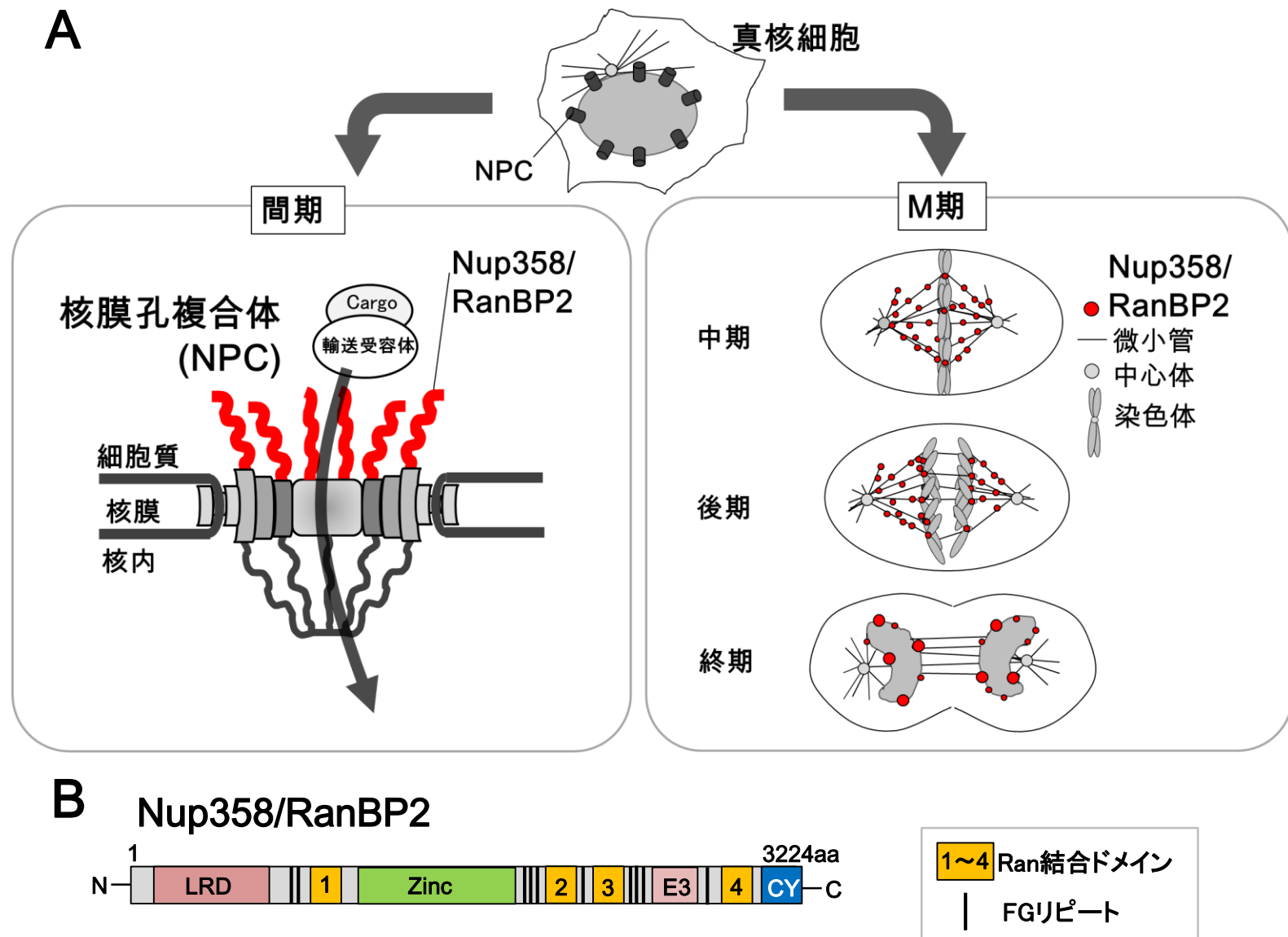


図1. ヌクレオポリンNup358/RanBP2の役割と構造

(A) Nup358/RanBP2 (赤) は、間期ではNPCの細胞質線維構造を形作り、細胞質-核間の物質輸送を制御する一方、M期では紡錘体-キネトコア領域に局在し、染色体分離に寄与する。(B) Nup358/RanBP2のドメイン構造。N末端からロイシンリッチドメイン(LRD)、4つのRan結合ドメイン、8つのタンデムZincフィンガー(Zinc)、SUMO E3リガーゼドメイン(E3)、FGリピート、C末端cyclophilinホモロジードメイン(CY)を持つ。

BRAF様大腸癌細胞

非BRAF様大腸癌細胞

コントロール

Nup358/RanBP2
ノックダウン

または
ビノレルビン処理
(微小管重合阻害剤)

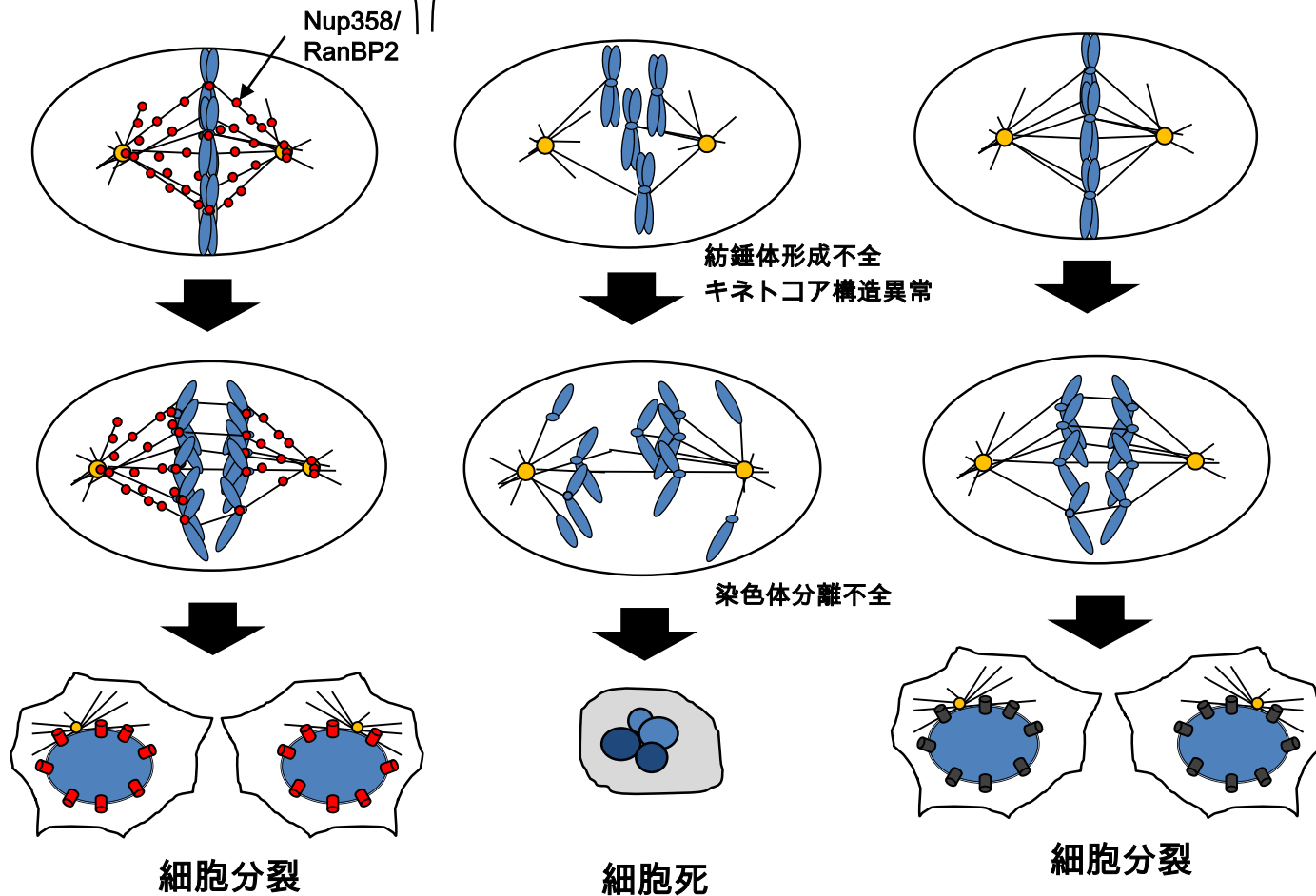


図2. BRAF様大腸癌細胞に対するNup358/RanBP2ノックダウン及びビノレルビン処理の効果
BRAF様大腸癌細胞にNup358/RanBP2ノックダウン、またはビノレルビン処理すると、非BRAF様大腸癌細胞と比較して染色体分離不全が増加し、その結果細胞死が有意に増加する。